

平成 21 年 5 月 26 日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19770076
 研究課題名 (和文) 黄色ブドウ球菌由来の鉄取り込み関連細胞壁結合型病原因子蛋白質 Isd の構造機能解析
 研究課題名 (英文) Structural and functional analysis of iron uptake related cell-wall anchored protein Isd from *Staphylococcus aureus*
 研究代表者
 田中 良和 (TANAKA YOSHIKAZU)
 北海道大学・創成科学共同研究機構・特任助教
 研究者番号：20374225

研究成果の概要：本研究課題では、高い病原性と薬剤耐性菌の出現により院内感染を引き起こすとして社会問題になっている、黄色ブドウ球菌の鉄獲得システムのひとつである Isd システムに着目し、Isd システムの蛋白質中に存在するヘム結合ドメイン、NEAT (NEAr Transporter) ドメインのヘム結合特性を解析した。その結果、1 分子の IsdH-NEAT3 が多分子のヘムと結合できることを見出した。この知見は、効率よくヘムを取り込むために発達した機能と推察される。本研究で解析した IsdH-NEAT3 は、Isd システムの最上流に位置する蛋白質であり、多分子のヘムを結合することで、系全体の効率の向上に貢献すると考えられる。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,200,000	0	2,200,000
2008 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	360,000	3,760,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物化学・構造生物学

キーワード：黄色ブドウ球菌, Isd システム, ヘム結合タンパク質

1. 研究開始当初の背景

黄色ブドウ球菌はヒトをはじめとした哺乳類に常在する細菌であるが、疾病により免疫機能の低下した患者や乳幼児に感染した場合は各種の毒素、免疫攪乱物質などを産生し、重篤な疾患を引き起こす。これに加え、黄色ブドウ球菌は各種抗生物質に対して容易に耐性を獲得するという劣悪な特徴を有しており、現在では人類の保有する全ての抗生物質に耐性を獲得してしまったことから、院内感染の原因菌として深刻な社会問題となっている。このような背景から、黄色ブドウ球菌に対する創薬の社会的意義は極めて深く、かつ急務であるが、有効な薬剤の獲得には至

っていない。

研究開始当初、注目されていたのが、黄色ブドウ球菌へのワクチン薬の創製である。これまで、黄色ブドウ球菌の表面に存在する莢膜を用いたワクチン薬の作製が報告され、米国の Nabi Biopharmaceuticals 社が StaphVAX というワクチン薬を開発した。しかし、2005 年 11 月、phase III の臨床試験において水準を満たす結果が得られなかったことで、開発が大幅に遅れると発表された。これにより黄色ブドウ球菌のワクチン薬開発は事実上大きく後退したが、2006、米国の Kuklin らにより、黄色ブドウ球菌の細胞表面に発現される蛋白質、IsdB (Iron surface determinant

B) が強力なワクチン候補となり得るという報告がなされ、Isd を対象とした新規な黄色ブドウ球菌に対する創薬研究が世界中で行われ始めた。

2. 研究の目的

本研究では、黄色ブドウ球菌のワクチン薬ターゲットとして有用な、Isd 蛋白質に含まれる NEAT ドメインの立体構造を、X 線結晶構造解析により原子レベルで解明し、得られる構造情報を生化学的データと組み合わせることにより各ドメインの分子機構についての詳細な知見を得て、創薬に有用な情報基盤を提供することを目指した。

3. 研究の方法

本研究では、NEAT ドメインの立体構造を、X 線結晶構造解析により原子レベルで解明し、得られる構造情報を生化学的データと組み合わせることにより各ドメインの分子機構についての詳細な知見を得て、創薬に有用な情報基盤を提供することを目指した。

4. 研究成果

本件級では、アポ状態の IsdH-NEAT3 ドメインおよび、IsdH の NEAT3 ドメインのヘムとの複合体の立体構造を、X 線結晶構造解析により決定した。ヘム分子は、IsdH-NEAT3 ドメインの分子表面に結合し、Tyr642 の側鎖の水酸基が中心の鉄原子に配位し、Ser563, Tyr646 がヘムの側鎖と水素結合を形成していた。ヘム結合部位には、Ser563, Val564, Met565, Phe568, Tyr593, Trp594, Val635, Val637, Ile640, Tyr642, Tyr 646, Val648 が存在しており、比較的疎水的な環境となっていた。また、ヘムの結合により周辺に存在する α -ターンが構造変化し、ヘムを挟み込む形で結合することが明らかになった。IsdH-NEAT3 ドメインと結合したヘムの接触可能表面積は 340Å² と算出され、表面の 44% が露出していた。他のヘム結合蛋白質においては、このように大部分が露出した形で結合している例はなく、したがって、このようなヘム結合様式は Isd システムに特徴的なものあるといえる。Isd システムが、宿主からヘムを獲得し、黄色ブドウ球菌体内にヘムを輸送する機構であることを考えると、ヘムが蛋白質の表面に結合することは、次の分子へとヘムを受け渡すための分子機構であると推察される。これらの知見は、研究開始当初には得られていなかった知見であり、今年度の研究成果により Isd システムの解明が大きく前進したといえる。

また、分析超遠心分離法、ゲルろ過クロマトグラフィーによる解析、等温滴定型熱量測定、分光光度計を用いたヘム結合解析により、1 分子の IsdH-NEAT3 が多分子のヘムと結合で

きることを見出した。X 線結晶構造解析では、2 分子の NEAT ドメインの間に結合したヘム分子がスタックして疎水性相互作用をしており、これは他のヘム結合蛋白質 Sph による多分子のヘム結合様式と類似していた。これまでに報告された NEAT ドメインはいずれも 1 分子のヘムと結合することを示唆したが、本研究により得られた、1 分子の NEAT ドメインが多分子のヘムと結合できるという知見は、効率よくヘムを取り込むために発達した機能と推察される。本研究で解析した IsdH-NEAT3 は、Isd システムの最上流に位置する蛋白質であり、多分子のヘムを結合することで、系全体の効率の向上に貢献すると考えられる。Isd システムの蛋白質は、黄色ブドウ球菌に対するワクチンとしての応用が期待されているが、本研究により、その分子特性を知ることができた。今後、これらの知見が、ワクチン薬の創成に応用されることを強く期待する。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 13 件)

1. R. Abe, M. Kudou, Y. Tanaka, T. Arakawa, and K. Tsumoto, Immobilized metal affinity chromatography in the presence of arginine, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 381, 306-310 (2009) 査読有り
2. Y.-G. Gao, H. Suzuki, H. Itou, Y. Zhou, Y. Tanaka, M. Wachi, N. Watanabe, I. Tanaka, and M. Yao, Structural and Functional Characterization of the LidR from *Corynebacterium glutamicum*: a Transcriptional Repressor Involved in L-Lactate and Sugar Utilization, *Nucleic Acids Res.*, 36, 7110-7123 (2008) 査読有り
3. M. Kuroda, R. Ito, Y. Tanaka, M. Yao, K. Matoba, S. Saito, I. Tanaka, and T. Ohta, Staphylococcus aureus Surface Protein SasG Contributes to Intercellular Autoaggregation of Staphylococcus aureus, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 377, 1102-1106 (2008) 査読有り
4. S. Sakamoto, Y. Tanaka, I. Tanaka, T. Takei, J. Yu, M. Kuroda, M. Yao, T. Ohta, and K. Tsumoto, Electron Microscopy and Computational Studies

- of Ebh, a Giant Cell-wall-associated Protein from *Staphylococcus aureus*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 376, 261-266 (2008) 査読有り
5. M. Watanabe, *Y. Tanaka, A. Suenaga, M. Kuroda, M. Yao, N. Watanabe, F. Arisaka, T. Ohta, I. Tanaka and K. Tsumoto, Structural basis for multimeric heme complexation through a specific protein-heme interaction: the case of the third NEAT domain of IsdH from *Staphylococcus aureus*, *J. Biol. Chem.*, 283, 28649-28659 (2008) 査読有り
 6. M. Nakakido, Y. Tanaka, M. Mitsuohori, M. Kudou, D. Ejima, T. Arakawa, and K. Tsumoto, Structure-based analysis reveals hydration changes induced by arginine hydrochloride, *Biophys. Chem.*, 137, 105-109 (2008) 査読有り
 7. M. Kuroda, Y. Tanaka, R. Aoki, D. Shu, K. Tsumoto and T. Ohta, *Staphylococcus aureus* Giant Protein Ebh is Involved in Tolerance to Transient Hyperosmotic Pressure *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 374, 237-241 (2008) 査読有り
 8. M. Ui, Y. Tanaka, T. Tsumuraya, I. Fujii, M. Inoue, M. Hiramata, and K. Tsumoto, How Protein Recognizes Ladder-Like Polycyclic Ethers: Interactions Between Ciguatoxin (CTX3C) Fragments and Its Specific Antibody 10C9 *J. Biol. Chem.*, 283, 19440-19447 (2008) 査読有り
 9. M. Nakakido, Y. Tanaka, M. Sokabe, and K. Tsumoto, Thermodynamic Analysis Reveals that GTP Binding Affects the Interaction between the alpha- and gamma-subunits of Translation Initiation Factor 2. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 371, 596-599 (2008) 査読有り
 10. T. Miyafusa, *Y. Tanaka, M. Kuroda, T. Ohta and K. Tsumoto, Expression, Purification, Crystallization, and Primary Diffraction Analysis of CapF, a Capsular Polysaccharide Synthesis Enzyme from *Staphylococcus aureus*. *Acta Cryst.*, F64, 512-515 (2008) 査読有り
 11. Y. Tanaka, S. Sakamoto, M. Kuroda, S. Goda, Y.-G. Gao, K. Tsumoto, Y. Hiragi, M. Yao, N. Watanabe, T. Ohta, and I. Tanaka, A helical string of alternately connected two three-helix bundles for the 1.1-Megadalton cell wall-associated adhesion protein Ebh from *Staphylococcus aureus*. *Structure*, 16, 488-496, (2008) 査読有り
 12. K. Makabe, T. Nakanishi, K. Tsumoto, Y. Tanaka, H. Kondo, M. Umetsu, Y. Sone, R. Asano, and I. Kumagai. Thermodynamic consequences of mutations in vernier zone residues of a humanized anti-human epidermal growth factor receptor murine antibody, 528. *J. Biol. Chem.*, 283, 1156-1166 (2008) 査読有り
 13. M. Nakakido, Y. Tanaka, and K. Tsumoto, The N-terminal domain of elastin-binding protein of *Staphylococcus aureus* changes its secondary structure in a membrane-mimetic environment. *J. Biochem. (Tokyo)*, 142, 131-134 (2007) 査読有り
- [学会発表] (計 10 件)
1. 第 8 回日本蛋白質科学会年会, 黄色ブドウ球菌由来 IsdH の NEAT3 ドメインの構造・機能解析, 田中良和, 末永亜由子, 黒田誠, Yao Min, 渡邊信久, 太田敏子, 田中勲, 津本浩平 (2008 年 6 月 10-12 日, 東京)
 2. 毒素シンポジウム, 黄色ブドウ球菌由来 Dro35 と高等生物由来解毒蛋白質の構造類似性, 田中良和, 大木優, 森川一也, 姚閔, 津本浩平, 渡邊信久, 大田敏子, 田中勲 (2008 年 7 月 2-4 日, 山中湖)
 3. 23rd Summer University in Hokkaido & 2008 年度北海道高分子若手研究会, 黄色ブドウ球菌由来巨大蛋白質 Ebh の構造解析, 田中良和 (2008 年 8 月 29-30 日, 北海道)
 4. Protein Society, A Helical String of Alternately Connected Two Three-helix Bundles for the 1.1-Megadalton Cell Wall-Associated Protein Ebh from *Staphylococcus aureus*, Yoshikazu Tanaka, Sou Sakamoto, Makoto Kuroda, Shuichiro Goda, Yong-Gui Gao, Kouhei Tsumoto, Yuzuru Hiragi, Min Yao, Nobuhisa Watanabe, Toshiko Ohta, and Isao Tanaka (2008 年 7 月 19-23 日, San

- Diego)
5. International Union of Crystallography 2008, Structural analysis of a giant cell wall-associated adhesion protein Ehb from *Staphylococcus aureus*, Yoshikazu Tanaka, Sou Sakamoto, Makoto Kuroda, Shuichiro Goda, Yong-Gui Gao, Kouhei Tsumoto, Yuzuru Hiragi, Min Yao, Nobuhisa Watanabe, Toshiko Ohta, and Isao Tanaka (2008年8月23-31日, 大阪)
 6. 2007年度日本生物物理学会北海道支部会, 黄色ブドウ球菌の細胞表層に存在する巨大蛋白質Ehbの構造解析, 田中良和, 坂本壮, 黒田誠, 郷田秀一郎, 高永貴, 津本浩平, 柊弓弦, 姚関, 渡邊信久, 太田敏子, 田中勲 (2008年3月18日, 札幌)
 7. SORST ジョイントシンポジウム(8), 抗シグトキシン抗体 1C49 のポリエーテル環の特異的認識における芳香族環の影響, 津本浩平, 横田亜紀子, 田中良和, 宇井美穂子, 円谷健, 藤井郁雄, 熊谷泉, 南雲陽子, 大栗博毅, 井上将行, 平間正博 (2008年1月29-30日, コクヨホール 東京)
 8. 第80回日本生化学会大会, 黄色ブドウ球菌由来 IsdH の NEAT3 ドメインのヘム結合特性, 田中良和, 渡邊正人, 末永亜由子, 黒田誠, Min Yao, 渡邊信久, 太田敏子, 田中勲, 津本浩平 (2007年12月11-15日, パシフィコ横浜 横浜)
 9. 2nd International Symposium on Diffraction Structural Biology 2007 (ISDSB2007), Crystal structure and heme binding property of the third NEAT domain of IsdH from *Staphylococcus aureus*. Y. Tanaka, M. Watanabe, A. Suenaga, M. Kuroda, M. Yao, N. Watanabe, T. Ohta, I. Tanaka, and K. Tsumoto, (2007年9月10-13日, 東京)
 10. 第7回蛋白質科学会年会, 黄色ブドウ球菌由来 IsdH-NEAT3 ドメインの構造・機能解析, 田中良和, 末永亜由子, 黒田誠, 姚関, 渡邊信久, 熊谷泉, 太田敏子, 田中勲, 津本浩平 (2007年5月24-26日, 仙台)

[図書] (計3件)

1. 田中良和, 津本浩平バイオテクノロジージャーナル 11-12月号 (シーエムシー出版, 2007, 646-647)
2. 田中良和, 津本浩平バイオテクノロジージャーナル 9-10月号 (シーエムシー出版, 2007, 529-530)

3. 田中良和, 津本浩平バイオテクノロジージャーナル 5-6月号 (シーエムシー出版, 2007, 273-274)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中 良和 (TANAKA YOSHIKAZU)

研究者番号: 20374225

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし